

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 7/62, 1/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/36086 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. August 1998 (20.08.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00585 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 1998 (04.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 06 023.4 17. Februar 1997 (17.02.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOCH, Rainhard [DE/DE]; Rybnikerstrasse 12, D-51065 Köln (DE). LUND, Henrik [DK/DK]; Norrebrogade 63,3, DK-2200 Kopenhagen N (DK). (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: DEGRADATION OF BIOLOGICALLY DEGRADABLE POLYMERS USING ENZYMES (54) Bezeichnung: ABBAU VON BIOLOGISCH ABBAUBAREN POLYMEREN MIT ENZYMEN (57) Abstract The invention relates to the complete degradation of shaped bodies, textile fabrics, coatings, bondings or foams made of biologically degradable polymers using enzymes. The invention particularly relates to enzymatic degradation of polyester amides and polyester urethanes with urea groups. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft den vollständigen Abbau von Formkörpern, Flächengebilden, Beschichtungen, Verklebungen oder Schäumen aus biologisch abbaubaren Polymeren mit Enzymen. Insbesondere betrifft sie den enzymatischen Abbau von Polyesteramiden und Harnstoffgruppen aufweisenden Polyesterurethanen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Abbau von biologisch abbaubaren Polymeren mit Enzymen

Die Erfindung betrifft den vollständigen Abbau von Formkörpern, Flächegebilden, Beschichtungen, Verklebungen oder Schäumen aus biologisch abbaubaren Polymeren mit Enzymen. Insbesondere betrifft sie den enzymatischen Abbau von Polyesteramiden und Harnstoffgruppen aufweisenden Polyesterurethanen.

Vollständig biologisch abbaubare und kompostierbare Werkstoffe gewinnen zunehmend an Bedeutung. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl derartiger Polymere mit dem Ziel entwickelt worden, einen Kunststoff verfügbar zu haben, der durch Kompostierung verwertet werden kann. Zur gleichen Zeit sind verschiedene Verordnungen und Normen erlassen worden, die den Zugang derartiger Materialien zur Kompostierung regeln (LAGA Merkblatt M 10) bzw. die schadlose Kompostierbarkeit nachzuweisen vermögen (DIN 54900). Unter biologischem Abbau wird in diesem Zusammenhang immer verstanden, daß die so bezeichneten Materialien in Gegenwart von Mikroorganismen durch diese vollständig zu CO₂ und Biomasse verstoffwechselt werden.

Von einigen Kunststoffen ist bekannt, daß deren Abbaubarkeit nicht nur durch das Wachstum von Mikroorganismen auf dem Polymer nachzuweisen ist, sondern auch mit Hilfe von Enzymen detektiert werden kann. Dabei wird das Prüfmateriel mit geeigneten Enzymen inkubiert und die Abbauprodukte werden analysiert (Jap. Pat. 56022324, Jap. Pat. 06322263, Polymer Degradation and Stability, 1992, S 241 - 248). Andere Autoren nutzen die enzymatische Abbaubarkeit zum Nachweis einer prinzipiellen biologischen Abbaubarkeit im Rahmen der Grundlagenforschung (Y. Tokiwa et al. in: J. E. Glass (Hrsg.) ACS Symposium series 433, 1990, S. 136 - 148). Im zitierten Artikel wird ausdrücklich erwähnt, daß ein vollständiger Abbau des Polymers nicht untersucht wurde. Über einen vermeintlich vollständigen Polymerabbau wird in (FR 93-6070) berichtet. Bei dem hier verwendeten Polypropylenfumarat erreicht man jedoch lediglich die Spaltung der Esterbindungen. Polypropylen, das bekanntermaßen nicht biologisch abbaubar ist, bleibt zurück. In allen bisher bekannten Fällen verlief der enzymatische Polymerabbau entweder nur in sehr geringem Umfang oder aber sehr langsam. Eine gezielte Auswahl von Enzymen, die die untersuchten Polymere besonders effizient und schnell abbauen, ist nicht erwähnt.

- 2 -

Ebenso wird nicht auf mögliche technisch umsetzbare Anwendungen eines vollständigen Polymerabbaus mit Hilfe von Enzymen hingewiesen.

5 Von Polyesteramiden ist allgemein bekannt, daß sie einem biologischen Abbau unterliegen können (J. Appl. Polym. Sci., 1979, S 1701 - 1711, US-Pat 4343931, US-Pat 4529792, Jap. Pat. 79119593, Jap. Pat. 79119594, EP-A 641817).

10 Von Harnstoffgruppen aufweisenden Polyesterurethanen ist ebenfalls bekannt, daß sie vollständig biologisch abbaubar sein können. Die Geschwindigkeit und der Umfang des Abbaus hängen von der Monomerzusammensetzung ab (DE-A 195 17 185). Der enzymatische Angriff einzelner Bindungen durch ein proteolytisches Enzym bei solchen Polymeren ist beschrieben worden (G. T. Howard, R. C. Blake, ASM General Meeting 1996, Abstracts S 430). Ein vollständigen Abbau einer Folie oder eines Formkörpers wird nicht beschrieben.

15 Es wurde gefunden, daß Formkörper aus biologisch abbaubaren Polymeren mit Hilfe von bestimmten Enzymen bzw. Mischungen dieser bestimmten Enzyme mit gegebenenfalls weiteren Enzymen vollständig abgebaut werden können. Es wurde weiterhin gefunden, daß ausgewählte Enzyme in der Lage sind, derartige Polymere in technisch umsetzbaren
20 Zeiträumen vollständig abzubauen. Dabei wird das Molekulargewicht des Polymers so weit reduziert, daß daraus hergestellte Produkte schnell bis zu den Monomeren abgebaut und vollständig aufgelöst werden. Dies gilt insbesondere für Folien, Flächegebilden, Beschichtungen, Verklebungen, Spritzgußteile und Granulate aus biologisch abbaubaren Polymeren.

25 Die Zeiträume, die für eine vollständige Auflösung des Polymers notwendig sind, sind außerordentlich kurz. Der zügige und vollständige Abbau gelingt aber nur, wenn eine spezielle Kombination von Polymer und Enzym gewählt wird. Hierdurch unterscheidet sich der gefundene Effekt ganz wesentlich von den bisher bekannten Arbeiten zum enzymatischen Abbau biologisch abbaubarer Polymere.
30

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum enzymatischen Abbau von biologisch abbaubaren Polymeren, insbesondere Polyesteramiden und Harnstoffgruppen aufwei-

- 3 -

senden Polyesterurethanen, wobei die biologisch abbaubaren Polymere mit einer wässrigen Lösung, die gepuffert sein kann, enthaltend eine oder mehrere Lipasen oder Cutinasen, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe der Lipase aus *Candida antarctica*, insbesondere Komponente B, der Lipase aus *Mucor Miehei* (z.B. Lipozyme 20.000 L), der Lipase aus *Aspergillus niger* und der Cutinase aus *Humicola insolens* oder eine oder mehrere dieser Lipasen und Cutinasen in Kombination mit weiteren Enzymen behandelt werden.

Als biologisch abbaubare und kompostierbare Polymere kommen aliphatische oder teilaromatische Polyester, thermoplastische aliphatische oder teilaromatische Polyesterurethane, die auch Harnstoffgruppen aufweisen können, aliphatisch-aromatische Polyestercarbonate und aliphatische oder teilaromatische Polyesteramide in Frage. Bevorzugt kommen Polyesteramide und Harnstoffgruppen aufweisende Polyesterurethane in Frage.

Die folgenden Polymere sind geeignet:

Aliphatische oder teilaromatische Polyester aus

A) linearen bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₂-C₁₂-Alkyldiolen, wie beispielsweise Ethandiol, Butandiol, Hexandiol, bevorzugt Butandiol, und/oder gegebenenfalls cycloaliphatischen bifunktionellen Alkoholen wie beispielsweise Cyclohexandimethanol und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₃-C₁₂-Alkyldiolen, wie beispielsweise Neopentylglycol, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₃-C₁₂-Alkylpolyole, wie beispielsweise 1,2,3-Propantriol oder Trimethylolpropan, sowie aus aliphatischen bifunktionellen Säuren, vorzugsweise C₂-C₁₂-Alkyldicarbonsäuren, wie beispielsweise und bevorzugt Bernsteinsäure oder Adipinsäure, und/oder gegebenenfalls aromatischen bifunktionellen Säuren wie beispielsweise Terephthalsäure oder Isophthalsäure oder Naphthalindicarbonsäure und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren wie beispielsweise Trimellitsäure oder

- 4 -

B) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette, beispielsweise Hydroxybuttersäure oder Hydroxyvaleriansäure oder Milchsäure, oder deren Derivaten, beispielsweise ϵ -Caprolacton oder Dilactid,

oder einer Mischung oder einem Copolymer aus A und B,

wobei die aromatischen Säuren nicht mehr als 50 Gew.-% Anteil, bezogen auf alle Säuren, ausmachen.

Die Säuren können auch in Form von Derivaten wie beispielsweise Säurechloride oder Ester eingesetzt werden;

Aliphatische oder teilaromatische Polyesterurethane, die auch Harnstoffgruppen aufweisen können, aus

C) einem Esteranteil aus bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C_2 - C_{12} -Alkyldiolen wie beispielsweise Ethandiol, Butandiol, Hexandiol, bevorzugt Butandiol, und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen oder polycyclischen aliphatischen Alkoholen wie beispielsweise Cyclohexandimethanol und/oder gegebenenfalls geringeren Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C_3 - C_{12} -Alkyldiolen, wie beispielsweise Neopentylglykol, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C_3 - C_{12} -Alkylpolyolen, wie beispielsweise 1,2,3-Propantriol oder Trimethylolpropan, sowie aus aliphatischen bifunktionellen Säuren, vorzugsweise C_2 - C_{12} -Alkyldicarbonsäuren, wie beispielsweise und bevorzugt Bernsteinsäure oder Adipinsäure, und/oder gegebenenfalls aromatischen bifunktionellen Säuren wie beispielsweise Terephthalsäure oder Isophthalsäure oder Naphthalindicarbonsäure und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren wie beispielsweise Trimellitsäure oder

- 5 -

- D) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen beispielsweise Hydroxybuttersäure oder Hydroxyvaleriansäure oder Milchsäure, oder deren Derivaten, beispielsweise ϵ -Caprolacton oder Dilactid,
- 5 oder einer Mischung oder einem Copolymer aus C und D, und
- E) aus dem Reaktionsprodukt von C und/oder D mit aliphatischen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und zusätzlich gegebenenfalls höherfunktionellen Isocyanaten, mit vorzugsweise 1 bis 12 C-Atomen bzw. 5 bis 8 C-Atomen
- 10 im Falle von cycloaliphatischen Isocyanaten, z.B. Tetramethyldiisocyanat, Hexamethyldiisocyanat, Isophorondiisocyanat, gegebenenfalls zusätzlich mit linearen und/oder verzweigten und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder höherfunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₃-C₁₂-Alkylpolyolen bzw. 5-8 C-Atomen im Falle von cycloaliphatischen Alkoholen, z.B. Ethandiol, Hexandiol, Butandiol, Cyclohexandimethanol, und/oder gegebenenfalls
- 15 zusätzlich mit linearen und/oder verzweigten und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder höherfunktionellen Dialkylaminen oder Aminoalkoholen mit vorzugsweise 2 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette, wie beispielsweise Ethylendiamin oder Aminoethanol und/oder gegebenenfalls weitere modifizierte Amine oder Alkohole wie beispielsweise Ethylendiaminethansulfonsäure, als freie Säure oder Salz,
- 20

wobei der Esteranteil C) und/oder D) mindestens 75 Gew.-%, bezogen auf die Summe aus C), D) und E), beträgt;

25

Aliphatisch-aromatische Polyestercarbonate aus

- F) einem Esteranteil aus linearen bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₂-C₁₂-Alkyldiolen wie beispielsweise Ethandiol, Butandiol, Hexandiol, bevorzugt Butandiol und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen Alkoholen, wie beispielsweise Cyclohexandimethanol und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise mit 3 bis 12 C-
- 30

- 6 -

Atomen in der Alkylkette, wie beispielsweise Neopentylglykol, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Alkoholen, vorzugsweise mit 3 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette, wie beispielsweise 1,2,3-Propantriol oder Trimethylolpropan, sowie aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette bevorzugt Adipinsäure,

oder

G) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette, beispielsweise Hydroxybuttersäure oder Hydroxyvaleriansäure oder Milchsäure, oder deren Derivaten, beispielsweise ϵ -Caprolacton oder Dilactid,

oder einer Mischung oder einem Copolymer aus F) und G) und

H) einem Carbonatanteil, der aus aromatischen bifunktionellen Phenolen, bevorzugt Bisphenol-A, und Carbonatspendern, beispielsweise Phosgen, hergestellt wurde.

Der Esteranteil F) und/oder G) muß mindestens 70 Gew.-%, bezogen auf die Summe aus F), G) und H) beträgt;

Aliphatische oder teilaromatische Polyesteramide aus

I) einem Esteranteil aus linearen oder aromatischen Alkoholen, vorzugsweise C₂-C₁₂-Alkyldiolen, wie beispielsweise Ethandiol, Butandiol, Hexandiol, bevorzugt Butandiol und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen Alkoholen wie beispielsweise Cyclohexandimethanol und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₃-C₁₂-Alkyldiolen, wie beispielsweise Neopentylglykol, und zusätzlich gegebenenfalls geringen

- 7 -

Mengen höherfunktionellen Alkoholen, vorzugsweise C₃-C₁₂-Alkylpolyole, wie beispielsweise 1,2,3-Propantriol oder Trimethylolpropan sowie aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette bzw. Phenyl- oder Naphtylringe, bevorzugt Adipinsäure, oder

K) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen in der Kohlenstoffkette, beispielsweise Hydroxybuttersäure oder Hydroxyvaleriansäure oder Milchsäure, oder deren Derivaten, beispielsweise ϵ -Caprolacton oder Dilactid,

oder einer Mischung oder einem Copolymer aus I) und K) und

L) einem Amidanteil aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Aminen mit vorzugsweise 1 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette bzw. C₅ oder C₆ cycloaliphatischen bifunktionellen Aminen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Aminen, unter den Aminen bevorzugt Isophorondiamin und besonders bevorzugt Hexamethyldiamin, sowie aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren, vorzugsweise mit 2 bis 12 C-Atomen in der Alkylkette, bevorzugt Adipinsäure, oder

M) aus einem Amidanteil aus säure- und aminfunktionalisierten cycloaliphatischen Bausteinen, vorzugsweise mit 4 bis 20 C-Atomen in der cycloaliphatischen Kette, bevorzugt ω -Laurinlactam und besonders bevorzugt ϵ -Caprolactam,

oder einer Mischung aus L) und M) als Amidanteil.

Der Esteranteil A) und/oder B) muß mindestens 30 Gew.-%, bezogen auf die Summe aus I), K), L) und M) betragen.

5 Alle biologisch und enzymatisch abbaubaren Polyesterurethane, Polyester, Polyester-carbonate und Polyesteramide haben ein Molgewicht von mindestens 10.000 g/mol und besitzen im allgemeinen eine statistische Verteilung der Ausgangsstoffe im Polymer. Bei polyurethantypischem Polymeraufbau, gegebenenfalls aus C) und D) sowie aus E) ist eine vollständig statistische Verteilung der Monomerbausteine nicht immer zu erwarten. Alle biologisch abbaubaren Polyesterurethane, Polyester, Polyester-
10 carbonate und Polyesteramide, bevorzugt Polyesterurethane, können als Substanz, Lösung oder Dispersion, als Dispersion bevorzugt in Wasser, vorliegen.

Die erfindungsgemäßen vollständig biologisch und enzymatisch abbaubaren Polyester-
urethane, Polyester, Polyestercarbonate und Polyesteramide können mit Füll- und
15 Verstärkungsstoffen und/oder mit Verarbeitungshilfsmitteln wie beispielsweise Nukleierungshilfsmitteln, Entformungshilfsmitteln oder Stabilisatoren ausgestattet sein, wobei darauf zu achten ist, daß die vollständige biologische und enzymatische Abbaubarkeit nicht beeinträchtigt wird oder die verbliebenen Substanzen im Sinne einer Weiterbehandlung (z.B. Abwasserreinigung) unschädlich sind.

20 Erfindungsgemäß geeignete Füll- und Verstärkungsstoffe können sein Mineralien wie beispielsweise Kaolin, Kreide, Gips, Kalk oder Talk oder Naturstoffe wie beispielsweise Stärke oder modifizierte Stärke, Cellulose oder Cellulosederivate oder Celluloseprodukte, Holzmehl oder Naturfasern wie beispielsweise Hanf, Flachs, Raps oder
25 Ramie.

Die erfindungsgemäßen vollständig biologisch und enzymatisch abbaubaren Polyester-
urethane, Polyestercarbonate und Polyesteramide können miteinander und auch mit
anderen Blendpartnern gemischt werden, wobei darauf zu achten ist, daß die verblie-
30 benen Substanzen im Sinne einer Weiterbehandlung (z.B. Abwasserreinigung) unschädlich sind. Als weitere Blendpartner können andere biologisch abbaubare oder biologisch nicht abbaubare Polymere verwendet werden.

Für den enzymatischen Abbau wird die Lipase aus *Candida antarctica* Komponente B., die Lipase aus *Aspergillus niger* oder die Lipase aus *Mucor Miehei* (z.B. Lipozyme 20.000 L, Novo Nordisk A/S, Dänemark) oder eine Mischung davon verwendet. Diese Enzyme können auch jeweils oder in Mischung mit weiteren Enzymen gemischt werden.

5

Das Verhältnis, in dem Enzyme in Kombination eingesetzt werden, ist durch deren Aktivität gegenüber dem Polymer oder seinen Abbauprodukten festgelegt. Die Enzyme können in einem Aktivitätsverhältnis 5:95 bis 95:5 eingesetzt werden, bevorzugt beträgt das Verhältnis 20:80 bis 80:20 und besonders bevorzugt 40:60 oder 60:40. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt beispielsweise über Freisetzung saurer Gruppen während des enzymatischen Polymerabbaus mittels Titration. Es können weitere lipolytische und/oder proteolytische Enzyme eingesetzt werden.

10

15

Weiterhin können Metallione, wie beispielsweise Natrium- oder Calciumione, zugesetzt werden. Anionische oder nichtionische Tenside wie beispielsweise sekundäre Alkoholethoxylate können ebenfalls zugesetzt werden.

20

Die erfindungsgemäß verwendbare Lipase (B) aus dem Stamm *Candida antarctica* Komponente B ist beschrieben in WO 88/02775.

25

Die Lipase Lipozyme 20.000 L ist ein Handelsprodukt der Fa. Novo Nordisk, Dänemark.

Die Lipase aus dem Stamm *Aspergillus niger* ist käuflich zu erhalten beispielsweise bei der Fa. Fluka, Buchs, Liechtenstein.

30

Als lipolytische Enzyme werden im Sinne dieser Erfindung Lipasen, Cutinasen, Esterasen, Phospholipasen und Lysophospholipasen bezeichnet. Die lipolytischen Enzyme stammen bevorzugt aus Mikroorganismen. Insbesondere stammen sie aus Bakterien, Pilzen oder Hefen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform können die lipolytischen Enzyme stammen aus *Absidia*, insbesondere *Absidia blakesleena* und *Absidia corymbifera*, *Aspergillus*, insbesondere *Aspergillus niger* und *Aspergillus flavus*, *Achromobacter*, insbesondere *Achromobacter iophagus*, *Aureobasidium*, insbesondere *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus*, insbesondere *Bacillus pumilus* und *Bacillus stearothermophilus*, *Brochot-*

- 10 -

rix, insbesondere *Brochotrix thermosophata*, *Candida*, insbesondere *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida paralyolitica* und *Candida antarctica*, *Chromobacter*, insbesondere *Chromobacter viscosum*, *Coprinus*, insbesondere *Coprinus cinerius*, *Fusarium*, insbesondere *Fusarium oxysporum* und *Fusarium solani*, *Geotricum* insbesondere *Geotricum penicillatum*, *Hansenula* insbesondere *Hansenula anomala*, *Humicola*, insbesondere *Humicola brevispora*, *Humicola brevis* var. *thermoidea* und *Humicola insolens*, *Hyphozyma*, *Lactobacillus*, insbesondere *Lactobacillus curvatus*, *Penicillium* insbesondere *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum* und *Penicillium expansum*, *Pseudomonas*, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas mephitica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantari*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina* oder *Pseudomonas stutzeri*, *Rhizomucor*, insbesondere *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus* insbesondere *Rhizopus japonius*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus nodosus*, *Rhodotorula*, insbesondere *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces*, insbesondere *Sporobolomyces shibatanus*, *Thermomyces*, insbesondere *Thermomyces lanuginosus* (früher *Humicola lanuginosa*), *Thiarosporella*, insbesondere *Thiarosporella phaseolina* und/oder *Trichoderma* insbesondere *Trichoderma harzanium*, *Trichoderma reesei*. Weiter können die lipolytischen Enzyme auch pflanzlichen oder tierischen Ursprungs sein.

20

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform stammen die lipolytischen Enzyme gemäß dieser Erfindung aus einem Stamm von *Candida cylindracea*, einem Stamm von *Candida antarctica* insbesondere die Lipase B aus *Candida antarctica* (WO 88/02775), aus einem Stamm von *Pseudomonas cepacia*, einem Stamm von *Hyphozyma*, einem Stamm von *Aspergillus niger* und/oder einem Stamm von *Mucor mihei*.

25

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das lipolytische Enzym eine Esterase, die aus einem Stamm von *Rhodospiridium*, insbesondere *Rhodospiridium toruloides* oder einem Stamm von *Pseudomonas* insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas maltophilia*.

30

Bevorzugt stammen die Proteasen aus Bakterien der Gattung *Bacillus*, besonders bevorzugt eignen sich Proteasen der Organismen *Bacillus alcalophilus* und *Bacillus licheniformis*.

5 Geeignete Mikroorganismen zur Herstellung der erfindungsgemäß geeigneten Enzyme, wie beispielsweise *Candida antarctica*, können nach den üblichen Methoden der Mikrobiologie isoliert werden, z.B. durch Anzucht auf üblichen Nährmedien und Prüfung auf Lipase-Aktivität. Die Isolierung und Reinigung der Enzyme erfolgt ebenfalls nach den üblichen Methoden (vgl. z.B. WO 88/2775).

10

Die zur Durchführung des Verfahrens benötigte wäßrige Lösung kann gepuffert sein. Der pH-Wert liegt im allgemeinen zwischen 2 und 12, bevorzugt zwischen 5 und 9 und besonders bevorzugt zwischen 6 und 8. Die Temperatur, bei der der enzymatische Abbau durchgeführt wird, liegt im allgemeinen zwischen 5 und 95°C liegen, bevorzugt liegt sie
15 zwischen 20 und 70°C und besonders bevorzugt zwischen 30 und 50°C. Alkohol/Wassergemische können ebenfalls als Lösungsmittel verwendet werden.

20

Folgende Puffer sind beispielsweise erfindungsgemäß einsetzbar: Citrat, Acetat, Phosphat, Formiat, Carbonat, Tris-hydroxymethylaminomethat, Triethanolamin, Imidazol, Oxalat, Tartrat, Fumarat, Maleinat, Phthalat, Succinat, Ethylendiamin sowie Gemische mehrerer
von ihnen. Bevorzugt werden Acetat, Phosphat und Citrat als Puffer eingesetzt.

Das Verfahren kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden:

25 Das Polymer wird der wässrigen Enzym-enthaltenden Lösung zugesetzt. Das biologisch abbaubare Polymer kann als Film, Folie oder Granulat zugesetzt werden. Formkörper können als Ganzes oder zerkleinert zugesetzt werden. Beschichtete oder verklebte Materialien oder Materialien, bei denen mit biologisch abbaubaren Polymeren Beschichtungen aufgetragen wurden oder Verklebungen erzeugt wurden, wie beispielsweise Papier oder Pappe
30 sowie beschichtetes Papier oder beschichtete Pappe, können als Ganzes oder zerkleinert der enzymhaltigen Lösung zugesetzt werden.

- 12 -

Weiter kann man die wässrige enzymhaltige Lösung durch Aufsprühen auf die abzubauen-ende Beschichtung oder den abzubauenden Formkörper auftragen oder aufsprühen.

Das beschriebene Verfahren des enzymatischen Abbaus von biologisch und enzymatisch abbaubaren Polymeren (=BUEAP) sowie daraus hergestellten Blends kann erfindungsgemäß beispielsweise eingesetzt werden zum bzw. zur

- Einschluß von Chemikalien, Wirkstoffen, Hormonen, Hilfsmitteln, Enzymen, Mikroorganismen, Pflanzensamen in BUEAP (z.B. Kapseln und Mikrokapseln) und deren gezielter Freisetzung durch den Zusatz von Enzymen.
- Einsatz von BUEAP als Kleber oder Binder zum Herstellen von Verbundmaterialien oder Formteilen aus nicht formbaren Materialien mit dem Ziel, diese durch Zusatz von Enzymen wieder aufzulösen.
- Einsatz von BUEAP zur Herstellung polymerer Verbunde wie beispielsweise Holzverbunde für Verschalungen (z.B. Bauverschalungen) mit dem Ziel, diese durch Zusatz von Enzymen aufzulösen bzw. ihre Ablösbarkeit zu beschleunigen
- Einsatz von BUEAP zum Beschichten, Verkleben oder Leimen von Pappe oder Papier mit dem Ziel, BUEAP enzymatisch abzubauen und zu entfernen. Dieses umfaßt insbesondere das Recycling von beschichtetem und/oder geleimtem Papier, Kaschierfolien oder Blisterverpackungen. Dieses umfaßt auch Blends aus BUEAP und nicht abbaubaren Polymeren, die durch die Enzymbehandlung ab- oder auflösbar werden. Dies umfaßt weiter das Beschichten von Pappe oder Papier mit BUEAP mit dem Ziel, schwer ablösbare Druckfarben (z.B. solche, die mit UV vernetzbar sind) mit Hilfe von Enzymen in einem Deinkingprozeß zu entfernen.
- Einsatz von BUEAP zum Verkleben oder Beschichten von Pappe oder Papier mit anderen Kunststoffen, Lacken oder metallischen Materialien insbesondere Aluminium mit dem Ziel, BUEAP enzymatisch abzubauen und so die anderen Kunststoffe, Lacke oder Metalle zu entfernen um sie gegebenenfalls zu recyceln. Folgende Kunststoffe oder Lacke sind u. a. erfindungsgemäß: Polyester, Polyamide,

- 13 -

Polyurethane, Polyolefine insbesondere Polyethylen und Polypropylen, Polyacrylate, Elastomere wie Kautschuk und seine Derivate, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat, Celluloseester, Acrylnitril enthaltende Styrolbutadienpolymere und Melaninharze. Dieses umfaßt insbesondere das Recycling von beschichtetem Papier, Kaschierfolien oder Blisterverpackungen.

5

10

15

20

25

30

- Einsatz von BUEAP als Binder für das Aufbringen von Mikrokapseln auf kohlefreie Durchschreibepapiere mit dem Ziel, den Binder selektiv durch Enzyme zu entfernen um das Papier zu recyceln.
- Einsatz von Formkörpern, Flächengebilden, Verklebungen, Beschichtungen oder Schäumen aus BUEAP mit dem Ziel, diese durch eine Vorbehandlung mit Enzymen abzubauen. Dies umfaßt insbesondere die Verflüssigung mit dem Ziel, die BUEAP nach Nutzung als Abfall über eine Kläranlage zu entsorgen oder das Volumen des Abfalls zu reduzieren.
- Herstellung von Formkörpern, Flächengebilden, Schäumen oder Beschichtungen die durch den Zusatz geeigneter Enzyme gezielt porenhaltig gemacht werden können.
- Herstellung von Fasern, Geweben, Textilien aus BUEAP, die durch den Einsatz von Enzymen aufgelöst oder in ihrem Volumen reduziert werden können.
- Einsatz von Enzymen zum Abbau von BUEAP mit dem Ziel, daraus wässrige Dispersionen herzustellen.
- Selektive Entfernung von Beschichtungen, Überzügen, Hüllen oder Lacken aus BUEAP mit Hilfe von Enzymen.
- Herstellung von Oligomeren aus BUEAP mit Hilfe von Enzymen.
- Herstellung von Flächengebilden, Formkörpern, Schäumen oder Beschichtungen, die Chemikalien, Wirkstoffe, Hilfsmittel, Enzyme, Mikroorganismen oder Pflan-

- 14 -

zensamen enthalten können, um diese auszubringen und durch enzymatischen Abbau dann freizusetzen.

- 5 - Herstellung von Verpackungen aus BUEAP jeder Art mit dem Ziel, das Verpackte zu behandeln und nach der Behandlung durch Zusatz von Enzymen wieder freizusetzen. Dies betrifft insbesondere das Verpacken von Wäsche und das enzymatische Auflösen der Verpackung in einem Waschgang. Dies betrifft weiter insbesondere die Sammlung von Nahrungsmittelresten oder anderen Gütern in Folien aus BUEAP mit dem Ziel, diese zu sterilisieren, steril zu lagern und dann durch Zusatz
10 von Enzymen wieder freizusetzen.
- Auflösen von Hygiene bags (Ostomy-Bags) für künstliche Darmausgänge mit Hilfe von Enzymen.
- 15 - Einsatz von BUEAP zur Herstellung von Druckfarben, mit dem Ziel, eine enzymatisch auf- und/oder ablösbare Farbe für einen enzymatischen Deinkingprozess herzustellen.
- 20 - Einsatz von BUEAP zum Verpacken von Wirkstoffen oder toxischen Verbindungen insbesondere Pflanzenschutzmitteln mit dem Ziel, eine enzymatisch auflösbare Verpackung oder ein enzymatisch auflösbares Inlay herzustellen, das ein schadstofffreies Recycling der Umverpackung ermöglicht.
- 25 - Einsatz von BUEAP zum Sammeln von Abfällen insbesondere Fäkalien mit dem Ziel, die Verpackung nach der Sammlung mit Hilfe von Enzymen aufzulösen um das Verpackte freizusetzen und/oder zu entsorgen.
- 30 - Einsatz vom BUEAP in Kombination mit anderen Werkstoffen oder als deren Beschichtung (z.B. Metallen oder nicht abbaubaren Kunststoffen) mit dem Ziel, die BUEAP nach Nutzung enzymatisch abzubauen um die anderen Werkstoffe zurückzugewinnen. Dies gilt insbesondere für das Recycling von elektronischen Bauelementen.

- 15 -

- Einsatz einer Kombination von BUEAP und Enzymen mit dem Ziel, die BUEAP mit Enzymen zu behandeln, um deren biologische Abbaubarkeit in einem Kompostierungsprozeß oder einem anaeroben Behandlungsprozeß zu beschleunigen.

Beispiele

Die in den Beispielen angegebenen Enzyme werden als Feststoff oder als flüssige Enzym-
lösung zugesetzt. Die zugesetzten Aktivitäten ergeben sich aus folgenden Angaben:

5

1. Lipozym 20.000 L (Lipase aus *Mucor Mihei*) ist ein Handelsprodukt der Firma
Novo Nordisk. Die Aktivität der Enzymlösung wird vom Hersteller garantiert. Sie
beträgt 20.000 Lipase Units/g. Dabei ist ein unit definiert als die Menge Enzym,
die aus Tributyrin pro Minute bei 30°C und pH 7,0 ein μmol Butyrat freisetzt. Die
10 Methode zur Aktivitätsbestimmung ist beim Hersteller unter der Bezeichnung „AF
95“ erhältlich.
2. Lipase Komponente B aus *Candida antarctica* ist eine Enzymlösung, deren Aktivi-
tät 16.000 LU/ml besitzt. Es wird ein experimentelles Produkt der Firma Novo
15 Nordisk eingesetzt. Die Aktivität ist wiederum definiert als Freisetzung von Buty-
rat aus Tributrin. Die Methode zur Aktivitätsbestimmung ist bei Novo Nordisk
unter der Bezeichnung „AF 95/5“ erhältlich.
3. Lipase aus *Aspergillus niger* ist ein Handelsprodukt der Firma Fluka. Die angege-
bene Aktivität beträgt 1 U/mg. Die Aktivität ist definiert als die Enzymmenge, die
20 1 μmol Ölsäure pro Minute bei pH 8 und 40°C aus Triolein (ebenfalls Fluka)
freisetzt.

Beispiel 1

25

Kleine Stücke einer Blasfolie mit einer Dicke von 50 μm aus Polyesteramid aus 60 Gew.%
Caprolactam und 40 Gew.% Ester aus Adipinsäure und Butandiol statistisch copolycon-
densiert mit einer relativen Lösungsviskosität von 2,5, gemessen an einer 1-gew.-%igen
Lösung in meta-Kresol bei 20°C werden in je 10 ml 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH
30 7,0 eingelegt.

- 17 -

Anschließend wird das Enzym in fester Form in der angegebenen Menge zugesetzt.

Die Inkubation erfolgt über mehrere Stunden.

5

Tabelle 1: Abbau von Polyesteramid

	Enzym	Eingesetzte Menge	Abbau
Beispiel 1	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> , Komponente B	3 mg	++
Kontrolle	Destilliertes Wasser		-
Kontrolle	Puffer		-

- 10 - kein Abbau, Folie intakt
 +- kaum Abbau, Folie fast vollständig
 + Abbau unvollständig, Folie zu zahlreichen Stücken zerfallen
 ++ vollständiger Abbau, Folie vollständig aufgelöst

- 15 Obiges Beispiel zeigt, daß ein vollständiger Abbau im Testzeitraum mit der Lipase aus *candida antarctica*, Komponente B erreicht wird. Die Kontrollexperimente belegen, daß der Zusatz von Wasser und Puffer das Polymer nicht abbauen bzw. nur unvollständig abbauen.

20

Beispiel 2

- 25 Spritzgußteile und Blasfolie unterschiedlicher Dicke aus Polyesteramid mit der gleichen Zusammensetzung wie in Beispiel 1 werden bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) in 200 ml 50 mM KP-Puffer pH 7,5 (0,02 % Na-Azid) inkubiert. 50 mg festes Enzymgranulat der Lipase Komponente B aus *Candida antarctica* werden zugesetzt. Während der Inkubation

der Proben wird der pH-Wert durch Zusatz von KOH konstant gehalten. Der vollständige Abbau der Probe wird durch visuelle Begutachtung bestimmt.

Tabelle 2: Abbau von Formkörpern mit Enzymen

5

Ansatz Nr. Beispiel 2	Dicke der Probe	vollständiger Abbau nach Tagen	Ausgangsgewicht des Polymeren [g]
1	Blasfolie 50 µm	0,21	0,35
2	0,9 mm	3,9	1,4
3	1,7 mm	6,6	1,7
4	4 mm	14	1,5
5	6 mm	22	1,8

Beispiel 3

10 Schreibpapier wird mit einer Blasfolie aus Polyesteramid mit der gleichen Zusammensetzung wie in Beispiel 1 beschichtet. Das beschichtete Papier wird in einem Mixer in kleine Stücke zerschlagen und in eine mit 50 mM KP-Puffer pH 7,0 (0,02 % Azid) gepufferte Lösung überführt. Es wird eine Stoffdichte von 3 % eingestellt. Der Lösung werden 0,5 %
 15 (v/v) einer Enzymlösung zugesetzt, die die Lipase Komponente B aus *Candida antarctica* enthält. In regelmäßigen Abständen werden dem Gemisch Proben entnommen, in denen der Gehalt an Adipinsäure gemessen wird. Diese ist im geprüften Polymer als Monomerbaustein enthalten.

20 In einem Vorversuch ist gefunden worden, daß eine dieser Beschichtung vergleichbare Blasfolie genau dann vollständig abgebaut worden ist, wenn der Gehalt an Adipinsäure in der Flüssigkeit 6 mmol/l übersteigt. Daher kann der vollständige Abbau der Papierbeschichtung über die Freisetzung von Adipinsäure verfolgt werden.

25 Innerhalb von 2 Stunden ist die Beschichtung vollständig aufgelöst. In einem Vergleichsansatz ohne Enzym wird kein Abbau der Beschichtung beobachtet.

Beispiel 4

300 mg Granulat eines Harnstoffgruppen aufweisenden Polyesterurethans (Degranil® DLN Handelsprodukt der Firma BAYER AG) werden zu 50 ml Kalium-Phosphat-Puffer, 200 mM, pH 6,95, 0,02 % Natriumazid gegeben. Anschließend werden unterschiedliche Enzyme in der angegebenen Menge zugesetzt. Die Einsatzmenge ist in der Tabelle 3 wiedergegeben. Angegeben ist jeweils die Endkonzentration im Ansatz. Die Endkonzentration flüssiger Enzyme beträgt 1 % (v/v). Bei festen Enzymen wird 0,1 % (w/v) zugesetzt. Nach 20, 51, 164 und 358 Stunden werden den Ansätzen Proben entnommen, in denen der pH-Wert und der Gehalt an Adipinsäure bestimmt wird. Adipinsäure ist eines der Monomere, aus denen das untersuchte Polymer aufgebaut ist. Am Ende der Inkubation wird der Gehalt an nicht abgebautem Polymer bestimmt. Dazu wird der gesamte Ansatz durch einen Faltenfilter gegeben und dessen Gewichtszunahme nach Trocknung bestimmt. Über die Gewichts Differenz gegenüber der ursprünglichen Menge wird der Abbaugrad bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Abbau des Harnstoffgruppen aufweisenden Polyesterurethans Degranil® DLN mit Enzymen

- Restpolymer nach Abschluß der Inkubation -

5

	Enzym	Menge des Restpolymers in %
Vergleich	ohne	101,6
Beispiel 4-1	1 % Lipozym 20.000 L v/v	8,6
Beispiel 4-2	1 % Lip.C.antarctica Komp. B. v/v	4
Beispiel 4-3	0,1 % Lip.A niger w/v	27,9

Degranil® DLN ist ein Handelsprodukt der Firma Bayer

Lipozym 20.000 L ist ein Handelsprodukt der Firma Novo Nordisk.

- 10 Die genannten 3 Enzyme sind in der Lage, das geprüfte Polymer in nennenswerten Umfang abzubauen. Die Lipase aus *C. antarctica* Komp. B. baut das Polymer besonders schnell ab. Bereits zum Zeitpunkt der ersten Probennahme beträgt der Gehalt an Adipinsäure über 13 mg/ml. Bei den übrigen Ansätzen erreicht die Menge an freigesetzter Adipinsäure erst am Ende der Inkubation ihr Maximum.

15

Beispiel 5

Enzymatischer Abbau von Polyesterurethanen

- 20 Als Prüfmateriel wird feines Granulat von Bionolle 1010 und 3030 eingesetzt. Bionolle 1010 und 3030 sind Handelsprodukte der Firma Showa Denko. Es handelt sich um Polyesterurethane, in denen Polyester mit geringen Mengen Diisocyanat verlängert sind.
- 25 300 mg feines Granulat des Polymers werden zu 100 ml Kalium-Phosphat-Puffer, 100 mM, pH 7, 0,02 % Na-Azid gegeben. Anschließend werden lipolytische Enzyme in der angegebenen Menge zugesetzt.

- 21 -

Die Einsatzmenge ist in der Tabelle wiedergegeben. Angegeben ist jeweils die Endkonzentration im Ansatz. Die Endkonzentration flüssiger Enzyme beträgt 1 % (v/v). Bei festen Enzymen wird 0,1 % (w/v) zugesetzt. Am Ende der Inkubation wird der Gehalt an nicht abgebautem Polymer bestimmt. Dazu wird der gesamte Ansatz durch einen Faltenfilter gegeben und dessen Gewichtszunahme nach Trocknung bestimmt. Über die Gewichts-
 5 differenz gegenüber der ursprünglichen Menge wird der Abbaugrad bestimmt.

Der Abbruch der Ansätze, die Bionolle 1010 enthalten, erfolgt nach 5 Tagen.

10

Der Abbruch der Ansätze, die Bionolle 3030 enthalten, erfolgt überwiegend nach 2 Tagen. Die Ansätze, die Bionolle 3030 enthalten und die die Enzyme Lipozyme und Lipase aus *Aspergillus niger* enthalten, erfolgt nach 3 Tagen.

15 Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

20 **Abbau von mit Diisocyanaten verlängerten Polyestern (Polyesterurethanen) durch Enzyme**

- Restpolymer nach Abschluß der Inkubation -

	Enzym	Bionolle 3030	Bionolle 1010
		% der Ausgangsmenge	
Kontrolle	ohne	102	
Beispiel 5-1	1 % Lipozyme 20.000 L	46	
Beispiel 5-2	1 % Lipase Cand. antarctica Komponente B	28	
Beispiel 5-3	0,1 % Lip. aus <i>Aspergillus niger</i>	53	
Kontrolle	ohne		99
Beispiel 5-4	1 % Lipase Cand. antarctica Komponente B		33

Lipozyme 20.000 L ist der Handelsname einer Lipase der Firma Novo Nordisk.

Beispiel 6

5 Enzymatischer Abbau von Polylactid

Als Prüfmaterial wird feines Granulat von Polylactid (=PLA) eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgt wie in Beispiel 4 beschrieben.

10 Nach 2 Tagen wird der Gehalt an nicht abgebautem Polymer bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 5

15

Abbau von Polylactid durch Enzyme

- Restpolymer nach Abschluß der Inkubation -

	Enzym	% der Ausgangsmenge
Kontrolle	ohne	100
Beispiel 6-1	1% Lipozyme 20.000L	11
Beispiel 6-2	0,1% Lip. aus <i>Aspergillus niger</i>	28

20

Beispiel 7

Enzymatischer Abbau eines Copolyesters

25 Als Prüfmaterial wird feines Granulat eines Polyesters, polykondensiert nach üblicher Veresterung aus 2797 g Dimethylterephthalat, 4217 g 1,4-Butandiol, 3157 g Adipinsäure und 3,1 g Titan-tetraisopropylat/Triphenylphosphat 1:1 eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgt wie in Beispiel 4 beschrieben.

- 23 -

Nach 5 Tagen wird der Gehalt an nicht abgebautem Polymer bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

5

Tabelle 6

Abbau von Copolyester durch Enzyme

10 - Restpolymer nach Abschluß der Inkubation -

	Enzym	% der Ausgangsmenge
Kontrolle	ohne	100
Beispiel	1% Lipase <i>Cand. antarctica</i> Komponente B	55

Beispiel 8

15 **Enzymatische Entfernung einer Polyesteramidbeschichtung und einer Polyethylenbeschichtung auf Papier**

Papiere, die mit biologisch abbaubarem Polyesteramid (siehe Beispiel 1) beschichtet sind oder auf die eine Polyethylen-Folie aufgeklebt ist, werden enzymatisch behandelt.

20 Zum Aufkleben des Polyethylens auf das Papier wird biologisch abbaubares Polyesteramid verwendet.

25 Jeweils 5 x 5 cm große Stücke von beschichtetem Papier werden ausgeschnitten und in einem verschlossenen 250 ml-Erlenmeyerkolben in 120 ml 0,1 M di-Kaliumhydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 6,5) bei 37°C unter starkem Schütteln (220 U/min) inkubiert. Die Pufferlösung enthält 0,5 % v/v Lipase aus *Candida antarctica* Komp. B und 0,02 % w/v Na-Azid.

Nach wenigen Stunden Inkubationszeit ist die biologisch abbaubare Polyesteramid-Beschichtung von dem Papier heruntergelöst. Dies kann an der leichten Trübung der Pufferlösung erkannt werden.

- 5 Nach 36 h hat sich die mit biologisch abbaubarem Polyesteramid aufgeklebte Polyethylen-Folie von dem Papier getrennt. In der Lösung schwimmen zwei getrennte Schichten von Polyethylen und Papier. Bei kleineren Papierstücken, die genauso beschichtet sind, erfolgt die Ablösung deutlich schneller.
- 10 In der Pufferlösung können die enzymatischen Abbauprodukte des Polyesteramids durch HPLC-Analytik nachgewiesen werden.

- Die Pufferlösung des Kontrollansatzes, der kein Enzym enthält, ist bei Versuchsabbruch nach 36 Stunden noch klar und enthält keine Abbauprodukte des Polyesteramids.
- 15

Beispiel 9

Verkleben von Papier mit biologisch abbaubarem Polyesteramid und anschließende enzymatische Trennung der Papierschichten

20

Papiere können mit biologisch abbaubarem Polyesteramid zusammengeklebt und anschließend durch enzymatische Behandlung mit Lipase aus *Candida antarctica* Komponente B wieder voneinander getrennt werden.

- 25 Dazu werden auf einer Heizplatte zwei ca. 2 x 2 cm große Papierstücke, zwischen die ein gleichgroßes Stück einer Folie aus biologisch abbaubarem Polyesteramids (siehe Beispiel 1) gelegt wird, bei ca. 140 °C zusammengeklebt. Zur Beschwerung legt man bei dem Klebevorgang auf die obere Papierschicht eine Metallplatte. Nach ca. 2 min
- 30 sind die beiden Papierschichten fest miteinander verklebt.

Zur Trennung der Papierschichten werden die verklebten Papiere in eine Petrischale, die 30 ml 0,1 M di-Kaliumhydrogenphosphat-Pufferlösung (pH 6,5) mit 2 % v/v Li-

- 25 -

pase aus *Candida antarctica* Komp. B und 0,02 % w/v Na-Azid enthält, gelegt. Unter leichtem Schütteln werden die Ansätze bei 37 °C inkubiert.

5 Nach 4 h haben sich die Papiere voneinander gelöst. In der Kontrollprobe, die kein Enzym enthält, kleben die beiden Papierschichten unverändert aneinander.

10 In gleicher Weise werden Papiere auch einseitig mit biologisch abbaubarem Polyesteramid beschichtet. Die Inkubation dieser Papiere unter den gleichen Bedingungen ergibt eine Ablösung der Polyesteramidschicht in drei Stunden. Der Nachweis erfolgt über Zunahme der Trübung.

Unter Verwendung einer gefärbten Folie kann der Nachweis des Abbaus auch über das Verschwinden der Farbe nachgewiesen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum enzymatischen Abbau von biologisch abbaubaren Polymeren,
wobei die Polymere mit einer wässrigen Lösung, die gepuffert sein kann,
5 enthaltend eine oder mehrere Lipasen oder Cutinasen oder eine oder mehrere
dieser Lipasen und Cutinasen in Kombination mit weiteren Enzymen behandelt
werden.
2. Verfahren zum enzymatischen Abbau von biologisch abbaubaren Polymeren
10 gemäß Anspruch 1, wobei die Polymere mit einer wässrigen Lösung, die gepuffert
sein kann, enthaltend eine oder mehrere Lipasen oder Cutinasen, ausgewählt aus
der Gruppe der Lipase aus *Candida antarctica*, der Lipase aus *Mucor Mjehei*, der
Lipase aus *Aspergillus niger* und der Cutinase aus *Humicola insolvens* oder eine
15 oder mehrere dieser Lipasen und Cutinasen in Kombination mit weiteren Enzymen
behandelt werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der pH der Lösung zwischen 2 und 12 liegt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei Alkohol/Wasser-Gemische als Lösungsmittel
20 verwendet werden können.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Polymer als Film, Folie, Granulat, oer als
Beschichtung, als Ganzes oder zerkleinert vorliegt.
- 25 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei als biologisch abbaubare Polymere aliphati-
sche oder teilaromatische Polyester, thermoplastische aliphatische oder teilaromati-
sche Polyesterurethane, die auch Harnstoffgruppen aufweisen können, aliphatisch-
aromatische Polyestercarbonate und/oder aliphatische oder teilaromatische Poly-
30 esteramide eingesetzt werden.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei als Polymere eingesetzt werden:
aliphatische oder teilaromatische Polyester aus

- 27 -

- 5 A) linearen bifunktionellen Alkoholen und gegebenenfalls cycloaliphatischen bifunktionellen Alkoholen und gegebenenfalls verzweigten bifunktionellen Alkoholen und zusätzlich gegebenenfalls höherfunktionellen Alkoholen sowie aus aliphatischen bifunktionellen Säuren und/oder gegebenenfalls aromatischen bifunktionellen Säuren und zusätzlich gegebenenfalls höherfunktionellen Säuren oder
- 10 B) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen oder deren Derivaten oder einer Mischung oder einem Copolymer aus A und B,
- 15 wobei die aromatischen Säuren nicht mehr als 50 Gew.-% Anteil bezogen auf alle Säuren, ausmachen, und die Säuren auch in Form von Derivaten eingesetzt werden können;
- aliphatische oder teilaromatische Polyesterurethane, die auch Harnstoffgruppen aufweisen können, aus
- 20 C) einem Esteranteil aus bifunktionellen Alkoholen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen oder polycyclischen aliphatischen Alkoholen und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Alkoholen, sowie aus aliphatischen bifunktionellen Säuren und/oder
- 25 gegebenenfalls aromatischen bifunktionellen Säuren und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren oder
- 30 D) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, oder deren Derivaten, oder einer Mischung oder einem Copolymer aus C und D, und
- E) aus dem Reaktionsprodukt C und/oder D mit aliphatischen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und zusätzlich gegebenenfalls höherfunktionellen Isocyanaten, gegebenenfalls zusätzlich mit linearen und/oder

- 28 -

5 verzweigten und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder höherfunktionellen Alkoholen, und/oder gegebenenfalls zusätzlich mit linearen und/oder verzweigten und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder höherfunktionellen Dialkylaminen oder Aminoalkoholen und/oder gegebenenfalls weitere modifizierte Amine oder Alkohole als freie Säure oder Salz,

10 wobei der Esteranteil C) und/oder D) mindestens 75 Gew.-%, bezogen auf die Summe aus C), D) und E), beträgt;

Aliphatisch-aromatische Polyestercarbonate aus

15 F) einem Esteranteil aus linearen bifunktionellen Alkoholen, und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen Alkoholen, und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Alkoholen, sowie aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren,

20 oder

G) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, oder deren Derivaten,

25 oder einer Mischung oder einem Copolymer aus F) und G) und

H) einem Carbonatanteil, der aus aromatischen bifunktionellen Phenolen, und Carbonatspendern hergestellt wird, wobei

30 der Esteranteil F) und/oder G) mindestens 70 Gew.-%, bezogen auf die Summe aus F), G) und H) beträgt;

Aliphatische oder teilaromatische Polyesteramide aus

- 29 -

- 5 I) einem Esteranteil aus linearen oder aromatischen Alkoholen, und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen Alkoholen und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Alkoholen, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Alkoholen, sowie aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen, und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren, oder
- 10 K) aus säure- und alkoholfunktionalisierten Bausteinen, oder deren Derivaten,
- oder einer Mischung oder einem Copolymer aus I) und K) und
- 15 L) einem Amidanteil aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen Aminen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Aminen, sowie aus linearen und/oder cycloaliphatischen bifunktionellen und/oder gegebenenfalls geringen Mengen verzweigten bifunktionellen und zusätzlich gegebenenfalls geringen Mengen höherfunktionellen Säuren, oder
- 20
- M) aus einem Amidanteil aus säure- und aminfunktionalisierten cycloaliphatischen Bausteinen, vorzugsweise mit 4 bis 20 C-Atomen in der cycloaliphatischen Kette, bevorzugt ω -Laurinlactam und besonders bevorzugt ϵ -Caprolactam,
- 25
- oder einer Mischung aus L) und M) als Amidanteil, wobei der Esteranteil A) und/oder B) mindestens 30 Gew.-%, bezogen auf die Summe aus I), K), L) und M) beträgt.
- 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/00585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC6: C12P 7/62, C12P 1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9426812 A1 (CRAY VALLEY S.A.), 24 November 1994 (24.11.94), Claims 1 and 8; and Abstract	1-7
X	File WPI, Derwent accession no. 94-039714, AMANO PHARM KK: "Decomposition of aliphatic polyester(s) giving improved fibre texture without loss of strength - using immobilised lipase bound with water soluble polymer carrier, derived from Pseudomonas spp."; JP,A,5344897, 931227	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 June 1998 (11.06.98)		8 July 1998 (08.07.98)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/00585

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STN International, File ZCA, Chemical abstracts, volume 126, no. 16, 21 April 1997 (Columbus, Ohio, US), Chikyu Kankyo Sangyo Gijutsu K: "Biodegradable, flexible polymer compositions"; & JP,A2,09020857, 970121	1-7
X	Monographs, Band 133, 1996, R-J Müller, "Mechanistic Studies on the Biodegradation of Polyester", page 209 - page 211, page 214, last paragraph - page 215, first paragraph	1-7
P,X	Polymers for Advanced Technologies, Band 8, n° N4, April 1997, M. Mochizuki et al, "Classification of aliphatic polyesters", page 203 - page 209, page 207, left hand column, last paragraph	1-7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00585

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 7/62, C12P 1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 9426812 A1 (CRAY VALLEY S.A.), 24 November 1994 (24.11.94), Ansprüche 1 und 8; und Zusammenfassung --	1-7
X	File WPI, Derwent accession no. 94-039714, AMANO PHARM KK: "Decomposition of aliphatic polyester(s) giving improved fibre texture without loss of strength - using immobilised lipase bound with water soluble polymer carrier, derived from Pseudomonas spp."; JP,A,5344897, 931227 --	1-7

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T"

Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angeht

"X"

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y"

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&"

Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11 Juni 1998

08.07.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Bevollmächtigter Bediensteter



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Carolina Gómez Lagerlöf

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00585

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STN International, File ZCA, Chemical abstracts, volume 126, no. 16, 21 April 1997 (Columbus, Ohio, US), Chikyu Kankyo Sangyo Gijutsu K: "Biodegradable, flexible polymer compositions"; & JP,A2,09020857, 970121 --	1-7
X	Monographs, Band 133, 1996, R-J Müller, "Mechanistic Studies on the Biodegradation of Polyester", Seite 209 - Seite 211, Seite 214, letzter Abschnitt - Seite 215, erster Abschnitt --	1-7
P,X	Polymers for Advanced Technologies, Band 8, Nr N4, April 1997, M. Mochizuki et al, "Classification of aliphatic polyesters", Seite 203 - Seite 209, Seite 207, linke Spalte, letzter Abschnitt -- -----	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören
29/04/98

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00585

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9426812 A1	24/11/94	AU 6848794 A FR 2705352 A,B	12/12/94 25/11/94

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

